一般報文

(昭和60年11月27日受理)

ポリスルホン製ホローファイバーへのペクチン酸リアーゼの吸着現象とその防止法

四国工業技術試験所 福岡 聰・小林良生

ADSORPTION OF *endo*-PECTATE LYASE ONTO THE POLYSULFONE HOLLOW FIBERS AND ITS PREVENTION METHOD

By Satoshi Fukuoka and Yoshinari Kobayashi

(Government Industrial Research Institute, Shikoku,
2-3-3, Hananomiya-cho, Takamatsu, 761, Japan)

Endo-pectate lyase (PATE) secreted by *Erwinia carotovora* (FERM P-7576) was found to be adsorbed onto the polysulfone hollow fibers during the ultrafiltration. The adsorption of the enzyme was confirmed by FT-IR-DR subtraction spectra. The adsorption curve was in accordance with the typical Langmuir adsorption isotherm. The maximum adsorption of the enzyme occurred at pH 8.3 and at low ionic strength.

For the purpose of preventing PATE from the adsorption onto the polysulfone hollow fibers, the addition of nonionic and cationic surfactant to crude enzyme solution was found to be effective. Among the surfactants, alkyl benzyl dimethyl ammonium chloride (ABDAC) was the best one to prevent the PATE from adsorption. The pretreatment of polysulfone hollow fibers with 0.2% ABDAC solution lead to the same effects as that of surfactant addition in the solution. The polysulfone hollow fibers were treated with 0.25% ABDAC solution for two hours. PATE was recovered quantitatively in the ultrafiltration by use of the polysulfone hollow fibers which was treated with 0.25% ABDAC solution for two hours.

(Received November 27, 1985)

1. 緒 論

靱皮繊維の生化学パルプ化¹⁾には *Erwinia carotovora* 起源のペクチン酸リアーゼ (PATE, EC 4. 2. 2. 2) が用いられる。パルプ化には製剤化した酵素が使用されるが、同菌株を培養し除菌した溶液は酵素活性が低いため、濃縮後製剤化される。酵素の活性を保持しつつ濃縮する方法として限外濾過法が知られている。多くの限外濾過膜が開発されタンパク質の濃縮などに応用されており、ポリスルホン製のホローファイバーは耐熱性、耐薬品性などの特徴があることから多用されている。

限外濾過法によるタンパク質濃縮の際の問題点として、タンパク質が膜面に吸着し、透過抵抗が増加し、濃縮効率を低下させることが知られている²⁻⁶⁾。流束の向上な

ど濾過効率の改善の目的で、固定化プロテアーゼによる処理⁶⁾やノニオン性界面活性剤処理⁷⁾などが報告されている。著者らはPATE粗酵素溶液の限外濾過濃縮をポリスルホン製ホローファイバーを用いて予備的に検討した。その結果、濃縮液中の酵素の力価は期待値よりも低く、十分な酵素回収率が得られないことがわかった。

本報告では、限外濾過濃縮の際のPATEの低回収率がポリスルホン製ホローファイバーへの吸着に由来することを明らかにし、濃縮時のPATE吸着を抑制し回収率を向上させるため界面活性剤処理法を検討した。

2. 実験方法

2.1 粗酵素溶液の調製

PATE粗酵素溶液は既報の方法^{8,9)}により *Erwinia*

carotovora (FERM P-7576) を発酵槽で培養して得た。培養後、菌体を 8500 rpm で 30 分間遠心分離し、得られる酵素を含有する上澄液を酵素の安定性を保つため 1N の HCl 溶液により pH 7.0 に調整した。PATE の量は酵素活性を Vaughn¹⁰⁾ の修正法により測定し、力価 (単位/ml) で表した。

2.2 界面活性剤

カチオン性界面活性剤として、第 4 アルキルアミン塩のアルキルベンジルジメチルアンモニウムクロライド (花王製、商品名: サニゾール B-50, ABDAC) とアルキルトリメチルアンモニウムクロライド (花王製、商品名: コータミン 24P, ATAC), ノニオン性にはポリエテル化合物のポリオキシエチレンラウリルエーテル (花王製、商品名: エマルゲン 105, PELE) およびアニオン性にはアルキルスルホニウム塩のドデシル硫酸ナトリウムとドデシルベンゼン硫酸ナトリウム (和光純薬製, SDS, SDBS) を用いた。また、参考に疎水基を有しない第 3 アルキルアミン塩のトリエチルアンモニウムクロライド (和光純薬製, TAC) を用いた。

2.3 限外濾過装置及び実験条件

限外濾過濃縮に用いた装置の概略を図 1 に示す。限外濾過モジュールにはポリスルホン製のホローファイバー (旭化成製, 分画分子量: 3000, 有効濾過面積: 4.7 m² または 0.2 m²) が取り付けられている。溶液の循環流速は濾過面積 4.7 m² のモジュールの場合には 80 l/min, 0.2 m² の場合は 2 本を並列に接続し 20 l/min に設定した。濾過圧力は圧力ゲージ 1 と 2 の平均値で表した。

2.4 吸着実験

酵素や界面活性剤の吸着実験には、ポリスルホン製ホローファイバーを 5 cm の長さで切断して用いた (以下、膜片と呼ぶ)。膜片は外径 1 mm, 内径 0.8 mm で 1 本当たり 1.26 cm² の有効濾過面積を有する。酵素の吸着実験は、

Fig. 1 Schematic diagram of ultrafiltration system.

有効濾過面積として 25 または 50 cm² 相当量の膜片を 10 ml の粗酵素溶液に投入し 5℃ にて 250 rpm で振とうして行った。振とう後、溶液の酵素力価を測定し、初期値に対し溶液から失なわれた力価の割合を吸着率、溶液中に残存している力価の割合を回収率として、それぞれパーセントで表した。界面活性剤溶液での吸着実験も同様の方法で 25℃ で行い、吸着量は溶液の全有機炭素 (TOC) の変化から求めた。

3. 結果と考察

3.1 粗酵素溶液の限外濾過濃縮

PATE の力価が 25.5 単位/ml の粗酵素溶液 80 l を有効濾過面積 4.7 m² の限外濾過モジュールにより濃縮した。濾過圧力 0.09 MPa, 流速 80 l/min および溶液の平均温度は 17℃ の条件で、透過流速の平均は 320 ml/m²・min であった。酵素液を 4 倍に濃縮したとき、濃縮液の PATE 力価は 69.6 単位/ml で、液量比から期待される 102 単位/ml より低く、酵素の回収率は 68% に留まっていた。酵素の回収率低下の原因として、流出液への酵素の漏出、濃縮操作による酵素の失活、ホローファイバー膜面への酵素の吸着などが考えられた。しかし、流出液中の酵素の力価は 0.07 単位/ml と低く、総量の 0.2% にすぎなかった。また、図 1 のバルブ 3 を開け、酵素液を単に循環させた場合、1 時間後でも酵素活性は 97% 保持されており失活は見られなかった。従って、回収率の低下は酵素の変性によるのではなく、ポリスルホン製ホローファイバーへの吸着によると推測された。未回収酵素の全量がホローファイバーに吸着したとすると、単位有効濾過面積当りの酵素吸着量は 14 単位/cm² に相当する。

さらに、酵素の吸着を FT-IR-DR 法により検討した。図 2 に示すように、未処理ホローファイバーおよび濃縮粗酵素液に浸漬したホローファイバー表面の拡散反射赤外スペクトルには大きな違いは見られないが、両者の差スペクトルにはタンパク質に特有の 3 つのアミドバンドの吸収¹¹⁾ が明瞭に見出された。また差スペクトルは精製 PATE 粉末の拡散反射スペクトルと一致しており、酵素のポリスルホン製ホローファイバーへの吸着が確認された。

3.2 PATE のホローファイバーへの吸着

粗酵素溶液の濃縮実験で、PATE がポリスルホン製ホローファイバー膜面に吸着することがわかったので、酵素の吸着等温線を求め、また、吸着に及ぼす pH, 塩濃度の影響等を基礎的に検討した。吸着速度の測定から、約 20 時間で吸着平衡に達していることが明らかとなったので、以後の実験では振とう時間は 24 時間とした。

吸着等温線の測定は 489 単位/ml に濃縮した粗酵素溶

Fig. 2 FT-IR spectra by diffused reflection method. (1) virgin polysulfone hollow fiber, (2) polysulfone hollow fiber after the adsorption of PATE, (3) subtraction spectrum between (1) and (2) with coefficient FCR=1.245, and (4) PATE purified by gelfiltration.

液を蒸留水で希釈し、力価の異なる溶液を調製して行った。単位濾過面積当りの酵素吸着量を溶液の酵素力価に対して求め図3に示した。曲線は以下の(1)式で示されるLangmuir型等温式に従い、タンパク質のポリ塩化ビニル膜などへの吸着^{12,18)}と同様の機構が推測された。また、図3を(2)式に従って図示し、直線の勾配から飽和吸着量を求めると65単位/cm²となった。前述した限外

$$V = \frac{abC}{1+aC} \quad (1)$$

$$\frac{C}{V} = \frac{1}{ab} + \frac{C}{b} \quad (2)$$

V: 濾過面積当りの吸着量 (単位/cm²)

a: 定数

b: 飽和吸着量 (単位/cm²)

C: 平衡濃度 (単位/ml)

濾過濃縮実験での吸着量、14単位/cm²は上記の飽和吸着量に比べて著しく小さいが、これは濃縮に要した時間が40分と短いことから、吸着平衡に達していないためと推測される。

タンパク質の膜への吸着は一般にその等電点付近で吸着量が極大を示す^{14,16)}ことから、PATE吸着のpH依存性を1NのHClあるいは2NのNaOH溶液により、pH 5.0~11.0に調整した粗酵素溶液を用いて調べた。図4に示すように、吸着率はpHがおおよそ8.3のとき極大値(約

Fig. 3 Adsorption isotherm for PATE onto polysulfone hollow fibers.

Fig. 4 The pH dependence of PATE adsorption onto polysulfone hollow fibers.

Fig. 5 Ionic strength dependence of PATE adsorption onto polysulfone hollow fibers.

70%)を示し、pH 9を越えると著しく低下した。極大値を示すpHはPATEの等電点10.0~10.9¹⁰⁾よりは低い、これは共存する多糖類その他の影響によるものと考えられる。

次に粗酵素溶液にNaClを添加し酵素吸着に及ぼす塩

濃度の影響をpH 7.0において調べた。図5に示すように、塩濃度が高くなるに従い、吸着率は62%から2mol溶液中での28%と低下し、通常の非多孔性膜へのタンパク質の吸着¹⁶⁾と類似した挙動を示した。

3.3 界面活性剤の添加による酵素吸着の防止

PATEのポリスルホン製ホローファイバーへの吸着は、前節で述べたように、pHや塩濃度を変えることによってある程度抑制される。しかし、酵素の安定性や実用上の観点から見ると、pHや塩濃度の変化は好ましくない。さらに効率の良い吸着防止法を確立するために、界面活性剤の添加法について検討した。

親水性基の異なるアニオン性、ノニオン性およびカチオン性の界面活性剤を選び、粗酵素溶液にそれぞれの界面活性剤を所定量加え、さらに膜片を浸漬し吸着実験を行った。界面活性剤濃度に対する酵素回収率の変化を図6に示す。アニオン性界面活性剤の場合SDS、SDBSいずれも0.1%の濃度で酵素回収率は1%以下となり、未添加の場合より低い値となった。一方、ノニオン性、カチオン性界面活性剤の場合、界面活性剤の添加により酵素の回収率は著しく上昇した。特に、ABDACの場合0.1%でもほぼ100%酵素が回収できた。なお、疎水性鎖をもたないTACの場合、添加の影響はほとんど見られなかった。

また、界面活性剤にはタンパク質を変性させる作用¹⁷⁾があることから、次に界面活性剤添加のPATE活性に及ぼす影響について検討した。力価が120単位/mlの粗酵素溶液9mlに、界面活性剤を濃度が0.03~0.4%となるように添加し、蒸留水を加え10mlに定容し、5℃または30℃にて250rpmで振とうした。24時間後の力価の回収率を図7に示す。SDSを添加した場合には5℃においても酵素活性は著しく低下し、0.1%濃度での酵素回収率はおよそ50%となった。一方、ノニオン性のPELEおよびカチオン性のABDACとATACは、いずれも5℃では酵素活性への影響はほとんどなく、0.4%の添加でも各々85%以上の酵素活性を保持していた。30℃のときにはノニオン性界面活性剤では酵素の失活は起こらなかったが、カチオン性界面活性剤では濃度0.1%以上で失活が進んだ。しかし0.03%付近では界面活性剤未添加の場合より酵素の回収率は高く、ノニオン性およびカチオン性界面活性剤はいずれも微量の添加によりPATEを安定化させる利点を持つことがわかった。

3.4 界面活性剤のホローファイバーへの吸着

界面活性剤のホローファイバーへの吸着について、SDSまたはABDAC溶液に膜片を浸漬することにより検討した。吸着速度は酵素の吸着に比べ著しく速く、2時間程で吸着平衡に達した。図8に示す吸着等温線から

Fig. 6 Influence of the surfactant addition on PATE adsorption.

Fig. 7 Influence of the surfactant on the stability of PATE activity.

(2)式に従って図示し、単位濾過面積当りの飽和吸着量を求めると、TOCに換算してSDSで 0.20 mg/cm^2 、ABDACで 0.22 mg/cm^2 となり、親水性基の種類に無関係にはほぼ同程度吸着した。

以上のことから、界面活性剤を添加した場合には、ホローファイバーに界面活性剤が速やかに吸着し、酵素の吸着サイトを覆うため酵素の吸着が抑制されるものと推

Fig. 8 Adsorption isotherm for surfactant onto polysulfone hollow fibers.

測される。アニオン性界面活性剤の SDS および SDBS で酵素回収率が低いのは、酵素のホローファイバーへの吸着によるよりもむしろ酵素の失活の影響が大きいと考えられる。

3.5 界面活性剤によるホローファイバーの予備処理

ABDAC などの界面活性剤はポリスルホン製ホローファイバーに吸着し酵素の吸着を抑制することが判明したので、ホローファイバーの予備処理に ABDAC を利用することを検討した。膜片を 0.05～0.3% の ABDAC 溶液に投入し振とうした後引き上げ、粗酵素溶液による吸着実験を行った。図 9 に示すように ABDAC の濃度が 0.2% 以上の溶液に浸漬した膜片の場合、酵素は 90% 以上回収され、界面活性剤でホローファイバーを浸漬処理しても吸着は抑制できることがわかった。

次に、限外濾過モジュールをくり返し使用するためには、濃縮に使用後 NaClO などによる洗浄が必要である。従って界面活性剤による予備処理法を実際の膜濃縮に応用するためには、浸漬処理によって吸着した界面活性剤が NaClO 洗浄により脱離しないことが望ましい。洗浄の影響について、ABDAC 溶液に予備浸漬した膜片により調べた。洗浄は予備浸漬した膜片を 2% NaClO 溶液中で 30 分間振とうし、蒸留水で 2 回すすぐことにより行った。同膜片による酵素の吸着実験では、図 9 に示したように予備浸漬のみの場合と同程度の酵素回収率を得ており、ABDAC 処理したホローファイバーの NaClO 洗浄は支障ないことがわかった。

Fig. 9 Influence of the ABDAC treatment on PATE adsorption.

3.6 限外濾過濃縮への応用

PATE 粗酵素溶液の限外濾過濃縮に、ABDAC 予備処理を応用した。有効濾過面積 0.2 m^2 の限外濾過モジュール 2 本を並列に接続し、0.25% の ABDAC 溶液 5 l を室温 ($20 \sim 25^\circ \text{C}$) 下、流速 20 l/min 、圧力 0.09 MPa の条件で 2 時間循環させ予備処理を行った。同モジュールを用いて PATE 力価 98.4 単位/ml の粗酵素溶液 3 l を濃縮した。濾過圧力 0.19 MPa 、溶液の平均温度 10°C のとき流速は $170 \text{ ml/m}^2 \cdot \text{min}$ となり、400 分で 3.4 l にまで濃縮された。濃縮液の力価は 902 単位/ml で、流出液には 0.5 単位/ml 含まれていたが、酵素の回収率はほぼ 100% であった。

さらに、濃縮の進行に伴い Lowry らの方法¹⁸⁾ によるタンパク質濃度、TOC および PATE 力価を測定し、それらの間で相関を求めたところ、いずれの組合せも相関係数 0.99 以上を与え、回帰直線からの偏りも見られなかった。このことから、PATE の限外濾過濃縮に関しては、濃縮液中の分子量の分布はほとんど変わらないと推測される。

4. 結 論

ポリスルホン製ホローファイバーを用いた限外濾過法により、*Erwinia carotovora* 起源のペクチン酸リアーゼ (PATE) 粗酵素溶液を濃縮した場合、ホローファイバーに同酵素が吸着し酵素の回収率が低下した。PATE のホローファイバーへの吸着を FT-IR-DR 法によって確かめた。その結果吸着等温線は Langmuir 型に従い、

pH 8.3 でイオン強度が低い場合に吸着量は増加することが明らかになった。酵素の吸着を防止する目的で、各種界面活性剤を粗酵素溶液に添加して吸着実験を行い、界面活性剤のなかでも、第 4 アルキルアミン塩のアルキルベンジルジメチルアンモニウムクロライド (ABDAC) が酵素の吸着を著しく抑制することを見出した。また、ホローファイバーを ABDAC で浸漬処理することによっても同様に、酸素の吸着を抑制できることが明らかになった。ABDAC の 0.25% 溶液で 2 時間処理した限外濾過モジュールを用いて、PATE 粗酵素溶液の濃縮を行うと、濃縮液中の分子量分布や活性を保ちながら、ほぼ定量的に濃縮回収できることがわかった。

付記：本研究の一部は昭和 59 年 10 月の繊維連合研究発表会 (国立教育会館) において発表した。

文 献

- 1) 小林良生, 紙パ技協誌, **37**, 40 (1983)
- 2) Kenneth C. Ingham, Thomas F. Busly, Ylva Sablestrom and Franco Castio, *Polym. Sci. Technol.*, **13**, 141 (1980)
- 3) 岡野輝雄, 化学の領域, **135**, 43 (1982)
- 4) Matthiasson E., *J. Membrane Sci.*, **16**, 23 (1983)
- 5) Fane, A. G., Fell, C. J. D. and Waters, A. G., *J. Membrane Sci.*, **16**, 211 (1983)
- 6) J. A. Howell and O. Velicangel, *Polym. Sci. Technol.*, **13**, 217 (1980)
- 7) T. Swaninathan, Malay Chaudhuri and K. K. Sirker, *J. Colloid Interface Sci.*, **76**, (2) 573 (1980)
- 8) Nasuno, S. and Starr, M., *J. Biol. Chem.*, **241**, 5298 (1966)
- 9) Y. Kobayashi, K. Komae and H. Tanabe, *J. Ferment. Tech.*, **63**, (5), 451 (1985)
- 10) J. D. MacMillan and R. H. Vaughn, *Biochemistry*, **3**, 5298 (1966)
- 11) 塚田益裕, 奈倉正宣, 石川 博, 繊維学会誌, **41**, T-231 (1985)
- 12) W. J. Dillman and I. F. Miller, *J. Colloid Interface Sci.*, **44**, (2), 221 (1973)
- 13) Hanson Y. K. Chuang, K. King W. F., Mason, R., *J. Lab. Clin. Med.*, **92**, 483 (1978)
- 14) P. Bagchi and S. M. Birnbaum, *J. Colloid Interface Sci.*, **83**, (2), 460 (1981)
- 15) A. G. Fane, C. J. D. Fell and A. Suki, *J. Membrane Sci.*, **16**, 195 (1983)
- 16) H. Tanabe, Y. Kobayashi, Y. Matsuo, N. Nishi and F. Wada, *Agric. Biol. Chem.*, **48**, (8), 2133 (1984)
- 17) Jacqueline Reynolds, Sarah Herbert and Jacinto Steinhardt, *Biochemistry*, **7**, (4), 1357 (1968)
- 18) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)